动　物　学　研　究　2011, Feb. 32(1): 104−108　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2011.01104

乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的研究历程和展望

李　瑗*, 苏建家, 杨　春, 曹　骥, 欧　超, 梁　亮, 杨　芳, 王　琦

(广西肿瘤防治研究所 实验研究部 病理研究室，广西 南宁　530021)

摘要：乙型肝炎病毒(HBV)感染是全球和我国的重要健康问题, 建立方便有效的 HBV 感染动物体内模型是开展 HBV 相关基础和临床研究的重要前提。 该实验室地处乙型肝炎和肝癌高发流行的广西地区, 自建立以来一直以肝癌的病因、发病机制和化学预防作为主要研究方向, 于 20 世纪 80 年代初开始树鼩体内感染 HBV 模型方面的研究并持续至今。该文对此研究历程作一概述, 并重点介绍关于用新生树鼩慢性感染 HBV 的新进展。

关键词：树鼩; 动物模型; 乙型肝炎病毒

中图分类号：Q95-33; R373; Q959.832　　文献标志码：A　　文章编号：0254-5853-(2011)01-0104-05

Progress on establishment of tree shrew (*Tupaia*) chronic infection with HBV *in vivo*

LI Yuan *, SU Jian-Jia, YANG Chun, CAO Ji, OU Chao, LIANG Liang, YANG Fang, WANG Qi

(*Department of Experimental Pathology*, *Guangxi Cancer Institute*, *Nanning*　530021, *China*)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) infection is one of the important health problems worldwide, especially in China. Feasible and effective animal models of HBV infection *in vivo* are prerequisite for the HBV-related basic and clinical studies. Located in the highly prevalent region of HBV and hepatocellular carcinoma (HCC), the laboratory of Guangxi Cancer Institute has focused on the cause, pathogenesis and chemoprevention of HCC, and has started the work of establishing tree shrew (*Tupaia*) models of HBV infection *in vivo* since the early 1980s. This paper provides an overview of the research process, and highlights the new progress on the chronic infection of tree shrews after inoculated with HBV neonatally *in vivo*.

Key words: Tree shrew (*Tupaia*); Animal model; Hepatitis B virus

1　建立乙型肝炎病毒树鼩体内慢性感染模型的背景和意义

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是全球性的健康问题。我国是 HBV 感染高发流行区, 约有 7 亿人曾经感染 HBV, 其中慢性感染人数高达 1.2 亿, 占全球 HBV 感染总数的 1/3 左右。15%～35%的慢性乙型肝炎患者因肝硬化、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC, 肝癌)等终末期肝病而死亡。

肝癌是世界和我国常见并且预后凶险的恶性肿瘤, 在世界和我国全部恶性肿瘤死因中均位列第三。全世界 2007 年肝癌死亡例数为 68 万人, 其中 80%以上发生在发展中国家, 这其中 55%以上发生在我国(Thun et al, 2010)。我国肝癌发病率在过去 30 年一直呈上升趋势, 增长幅度高达约 250%, 仅次于肺癌(Zhao et al, 2010)。尽管已知 HBV 感染是我国肝癌的最主要病因, 但 HBV 慢性感染机制至今未能清楚阐明, 肝癌的发生机制及其防治方面的研究几十年来亦未获得突破性进展。

自 20 世纪 80 年代以来, 世界一些地区和我国先后开始的大规模新生儿乙型肝炎疫苗免疫接种计划已经显现出对降低儿童感染 HBV 和发生肝癌的作用, 表明其不失为一高性价比的肝癌预防策略

收稿日期：2010-11-29; 接受日期：2011-01-30
*通讯作者(Corresponding author), E-mail: liyuangx@yahoo.com.cn

(Lim et al, 2009；Zhou et al, 2009)，但我国原已有的庞大HBV感染人群以及由于HBV在治疗或预防免疫过程中发生突变导致免疫无效(Clements et al, 2010)而产生的新的HBV感染人群，仍处于发生慢性肝病的高风险之中。因此，HBV感染仍是我国当前和今后相当长时期内严重危害人民健康，需要优先解决的一个重大问题(Zhuang, 2009)。

缺乏合适的体内外感染HBV实验模型是阻碍HBV相关的基础和临床研究的主要瓶颈，其根本原因在于HBV属嗜肝DNA病毒科(Hepadnaviridae)，感染宿主的种属范围狭小、特异性严格，即各病毒只能感染一种和极少数其他相关物种。嗜肝DNA病毒科分为哺乳类(mammalian)和禽类(avian)两个属，前者包括人、毛猴、土拨鼠和地松鼠的嗜肝DNA病毒HBV、WMHBV、WHV和GSHV；后者包括鸭和苍鹭的嗜肝DNA病毒DHBV和HHBV。HBV是嗜肝DNA病毒的原型，在基因组结构的相似性和基因序列的同源性等方面与本家族其他成员有程度不同的差别。多年来，土拨鼠感染WHV模型和鸭感染DHBV模型在探索HBV感染人体的机制和研发临床用药等方面做出了很大的贡献，但将这两个动物模型的相关研究结果用于阐释人类感染HBV的相关事件，均尚存很明显的屏障。而黑猩猩感染HBV模型虽然已经得到公认，但因其为濒危珍稀大型动物而不适用于普通实验研究。因此，建立方便有效的、与人类有较近亲缘关系的动物感染人HBV模型，是研究HBV的生物学特性、感染致病机理及有效防治措施所亟需。

2　树鼩体内感染HBV模型的研究初始与进程

树鼩(*Tupaia*, tree shrew)属灵长目原猴亚目树鼩科，也有学者认为属灵长目与食虫目之间的独立阶元——攀鼩目，含不同的亚科、亚属和亚种，在我国主要分布于云南、广西等西南部省区。树鼩与人类在生理生化、代谢、基因组学等方面的相似性远高于大鼠、小鼠、土拨鼠等常用啮齿类实验动物(Novacek et al, 1992；Springer et al, 2003)，并具有个体小，便于实验操作、价廉易获得、能感染多种与人类疾病有关的病毒等显著特点。世界卫生组织(WHO)多年前就呼吁用树鼩代替大型灵长类动物进行科学实验，我国也于近年将树鼩资源的开发利用、标准化及建立人类疾病模型提到议事日程(Jiao et al, 2009)，并列入国家“十一五”科技支撑计划。

本实验室最早关于树鼩感染HBV的研究见于严瑞琪、苏建家等人于20世纪80年代的报道(Yan et al, 1984；Su et al, 1987)。该研究以人HBV感染者血清为感染源，分别两次经静脉和腹腔接种于树鼩(0.5 mL/次)，接种后定期采血作HBV感染相关的血清免疫学检测、斑点杂交法检测HBV DNA、生化检测转氨酶(ALT)、电镜观察HBV颗粒，部分动物的肝活检组织作免疫组化检测HBsAg和HBcAg、原位分子杂交检测HBV DNA。经过接种后137周的实验观察，结果显示87/96只(90.63%)树鼩血清和（或）肝组织出现HBV感染标志物，电镜下血清可查见Dane氏颗粒及HBsAg颗粒，Southern blot检测肝组织可见复制型及整合型HBV DNA。这些结果首次在国内外表明，树鼩可以感染人HBV，可以建立体内感染HBV动物模型。随后，应用树鼩进行实验诱发肝癌的研究结果显示，17只喂食黄曲霉毒素B1(AFB1)并且感染HBV、24只单纯喂AFB1和9只单纯感染HBV的树鼩，在158周的实验观察期内分别有9例(52.9%)、3例(12.5%)和1例(11.1%)发生HCC，表明HBV和AFB1在肝癌发生中具有协同作用，并从动物实验角度支持了HBV与HCC存在病因学关系的观点(Yan et al, 1987)。

在以上研究基础上，随着本实验室在树鼩的饲养、保定、抽血、麻醉和肝活检等动物实验技术的不断建立和提高(Ban et al, 1998a)，树鼩可以经受反复多次的抽血和剖腹肝活检手术，使观察其在实验诱发肝癌形成过程中的各时期血和肝组织的动态变化成为可能。在随后十余年期间，本实验室对HBV感染树鼩及其与AFB1在树鼩肝癌发生中的病因作用(Su et al, 1992；Li et al, 2000a)、发病机制(Ban et al, 1998b；Qin et al 1998；Li et al, 1999)和化学预防(Li et al, 2000b；Cao et al, 2005)等方面进行了系列研究，这些研究结果不仅显示了树鼩在建立乙型肝炎和肝癌等人类疾病模型方面的作用，也为这些人类疾病的相关基础研究做出了贡献。

国内外其他关于树鼩体内感染HBV模型的研究主要见于：Pang et al (1981)报道，野生成年树鼩经肌肉接种人HBV感染血清后，动物血清中不仅可测到HBsAg，还可在电镜下观察到大量的直径为22 nm的HBsAg颗粒；Li et al (1995)报道，用野生成年树鼩在感染HBV的基础上重叠感染丁型肝炎病毒(HDV，其感染需要嗜肝DNA病毒的帮助)获得

初步成功；Walter et al (1996)报道，用新生和成年树鼩接种人 HBV 后，观察大约 20 周，新生期接种的树鼩的表现类似于人类的急性自限性肝炎；而成年期接种的树鼩的仅表现为一过性感染。

然而，由于以上研究所用的树鼩多为野外捕获，年龄、遗传和健康背景不详，个体差异大，同时可能由于一些早期的实验研究在检测 HBV 感染标志物方面所用的 ELISA、免疫组化、原位杂交等方法或其试剂的特异性、敏感性不稳定，使某些检测结果的重复性不理想，致使一些学者对树鼩能否感染 HBV 提出质疑(Wang et al, 1996；Wang, 1998)。

3 优化 HBV 树鼩体内感染模型的探索

近十年来，本实验室一方面在应用树鼩进行肝癌病因和发病机制的基础研究中，通过新兴的高通量基因组学和蛋白质组学技术，对部分树鼩基因进行测序、制作基因芯片和进行肝癌相关基因的检测(Chen et al, 2005)，以及对树鼩肝癌发生过程中的关键基因和蛋白进行筛选和鉴定等研究(Qin et al, 2006；Li et al, 2008a,b)；另一方面，由于国内外开展树鼩感染 HBV 方面的研究虽已历时 20 余年，但树鼩体内能否长期感染 HBV 仍存在争议，树鼩模型还不能有效地应用于 HBV 相关研究。 为此，本实验室在优化树鼩体内慢性感染 HBV 模型方面也开展了一系列探索。

首先，基于人类的 HBV 慢性感染者主要源于围生期或幼年期被感染这一现象，即婴幼儿感染 HBV 后有很高的慢性化率；而大部分成年人感染 HBV 后病毒很快被清除，以及德国 Freiburg 大学 Blum 教授研究小组关于新生期树鼩感染 HBV 的效果优于成年树鼩的初步报道(Walter et al, 1996)，我们推测应用免疫系统尚未发育完善的围生期和幼年树鼩接种人 HBV 可能提高感染效率。

为此，本实验室借鉴在国际合作研究中探索到的人工繁育树鼩的经验(Li et al, 2001)，先在本实验室建立了树鼩的人工繁殖和育幼的基本方法和条件(Liang et al, 2005)，随后开展了用人工繁育的围生期(出生前后各 1 周)和幼年(1—3 月龄)树鼩感染人 HBV 的探讨。该探讨主要以巢式 PCR(nPCR)对实验树鼩的血和肝组织 HBV DNA 进行检测，初步结果提示，用围生期和幼年树鼩接种人 HBV 可以提高感染效率(Liang et al, 2006)。

其次，在此基础上，本实验室进一步对新生期接种 HBV 的树鼩体内的 HBV 感染标志物用多种检测方法进行长期动态观测，结果显示，树鼩血和肝组织中 HBV DNA 和 HBsAg 可持续阳性至接种后 48 周以上，并且 Southern blot 和 nPCR 检测到肝组织中 HBV cccDNA 等标志物，表明新生树鼩接种人 HBV 后，病毒能够在其体内长期存在和稳定复制(Yang et al, 2009)。

最近，为了进一步优化树鼩感染 HBV 模型，本实验室对各种可能影响树鼩感染 HBV 效率的因素，如不同的感染源、接种方式、检测方法和多种辅助措施，进行了较全面的探讨。该研究对 77 只新生树鼩和 49 只非新生(出生后 1 月至 1 年)树鼩用不同感染源、接种方式和辅助措施处理后，用多种检测方法对动物血和肝组织的 HBV 感染标志进行动态观察。结果显示，6 只新生期接种的树鼩确证为 HBV 慢性感染——其肝组织保持高拷贝的 HBV DNA 和血清保持高滴度的 HBsAg 长达接种后 72 周以上(最长达 228 周)，并且肝组织经 dot blot 检测 HBV DNA、免疫组织化学法检测 HBsAg 和 HBcAg 均显示阳性；另外，还有 7 只新生期接种的树鼩暂定为可疑慢性感染——其肝组织 HBV DNA 和血清 HBsAg 长期表现为间歇性低水平阳性；而 49 只非新生期接种的树鼩无一明确显示为慢性感染。该研究结果的主要意义有以下几方面：第一，再次证实树鼩能够感染 HBV 并成为 HBV 长期携带者，新生期接种 HBV 的树鼩感染效果优于非新生期接种；第二，在 6 只确认为持续感染和 7 只可疑为持续感染的新生期接种的树鼩中，分别有 1 只和 2 只是用同一只确证为慢性感染的树鼩血清接种的，表明树鼩间可以传代感染 HBV；第三，该研究在动物接种年龄、感染源、接种方式、辅助措施等方面筛选出一些影响树鼩感染 HBV 效率的因素，一定程度上实现了对树鼩体内感染 HBV 模型的优化，有利于今后工作的进一步开展。以上这些最新研究结果的相关论文正在整理中。

4 国内外现状和展望

前述的国内早年关于树鼩体内感染 HBV 的研究少见后续报道；而德国 Freiburg 大学 Blum 教授实验室自 1996 年报道用新生和成年树鼩体内感染 HBV 以及用树鼩的原代肝细胞体外感染 HBV 的系列研究结果(Walter et al, 1996)后，虽然仍一直开展树鼩感染肝炎病毒的相关研究，但主要转为用树鼩

肝细胞体外感染HBV或丙型肝炎病毒(HCV)，未见再有体内感染HBV的相关报道。

本研究室在树鼩体内慢性感染HBV方面的研究持续多年，虽然，最近关于确证树鼩能够慢性感染HBV的研究结果令人鼓舞，但还须在提高动物感染率和体内病毒载量，以及诱发动物出现类似人长期感染HBV后出现的慢性肝炎、肝硬化、肝癌等慢性肝病方面努力。在这一方面，我们认为对不同的树鼩种系、不同的HBV基因型/亚型和准种、不同的接种用血清的处理方法以及不同的免疫抑制药的应用等因素值得进一步探索。此外，本实验室最近的研究结果显示，一些树鼩于接种HBV后，肝组织长期保持低拷贝数的HBV DNA，但血清HBsAg却为阴性，这些动物是否类似于人类的"隐匿性感染"非常值得进一步观察和验证，因国内外已有研究显示隐匿性感染HBV的人群仍有传染下一代和自身发生肝癌或其他慢性肝病的危险性。

综上所述，树鼩体内外感染HBV的研究受到较多的关注，但开展相关研究，尤其是持续性研究的不多。因此，这一领域虽然多年来不断有所进展，但与建成理想的人类感染HBV动物模型仍有一定差距。而由于HBV和近年来日益受到重视的HCV感染及其相关的肝癌在我国和全球形势严峻，树鼩在人类疾病模型中的作用近年来在国内外得到较多关注，树鼩肝细胞的分离、培养等一些与肝炎病毒感染模型相关的基础研究近年在我国已有陆续报道。相信通过各相关领域的合力，理想的树鼩体内感染HBV和HCV模型将在肝癌、病毒性肝炎相关的基础和临床研究中发挥重要作用。

致谢：衷心感谢本系列研究的创始和奠基人严瑞琪教授，参与本系列研究前期或部分工作的陈志英、覃国忠、覃柳亮、班克臣、段小娴、岳惠芬等同事，参与本系列研究部分工作的张晶晶、杨光、翟丹梅等研究生，以及长期参与本系列动物实验的工人和众多在动物实验中给予帮助的研究生。感谢对本系列研究给予国家"八五"和"九五"攻关项目、国家自然科学基金项目(6 项)、广西科技厅项目(8 项)和广西卫生厅项目(3 项)资助的有关单位。

。

参考文献：

Ban KC, Su JJ, Yang C, Huang GH, Luo XL, Qin LL, Duan XX. 1998a. Techniques of tree shrew liver biopsy, anesthesia and blood collection [J]. *Shanghai Lab Anim Sci*, **18**(1):29-30. [班克臣, 苏建家, 杨春, 黄国华, 罗小玲, 覃柳亮, 段小娴. 1998. 树鼩肝活检及麻醉和抽血技术. 上海实验动物科学, **18**(1):29-30.]

Bank KC, SU JJ, Yang C, Huang GH, Qi LL, Li Y, Luo XL, Duan XX, Yan RQ. 1998b Relationship between the expression of P21 and human hepatitis B virus and aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in tree shrews [J]. *Chn J Oncol*, **20** (2): 111. [班克臣, 苏建家, 杨春, 黄国华, 覃柳亮, 李瑗, 罗小玲, 段小娴, 严瑞琪. 1998. 人乙型肝炎病毒与黄曲霉毒素B1诱发树鼩肝癌过程中肝组织P21表达与肝癌发生的关系. 中华肿瘤杂志, **20**(2):111.]

Cao J, Li Y, Zhang LS, Su JJ, Ou C, Yang C, Ban KC, Duan XX, Yue HF, Wei W, Ou SJ. 2005. Effect of tea polyphenal on chemopreventing hepatocellular carcinoma of tree shrew [J]. *Tumor*, **25**(2):118-121. [曹骥, 李瑗, 张丽生, 苏建家, 欧超, 杨春, 班克臣, 段小娴, 岳惠芬, 韦薇, 欧胜敬. 2005. 茶多酚在树鼩肝癌形成中的化学预防作用. 肿瘤 **25**(2):118-121.]

Chen YN, Cao J, Su JJ, Li Y. 2005. A cDNA microarray study of the differential expression of genes in signal transduction pathway during hepatocarcinogenesis in tree shrews [J]. *Chn J Hepatol*, **13**(10):763-767. [陈远能, 曹骥, 苏建家, 李瑗. 2005. 用树鼩cDNA 芯片研究树鼩肝癌中参与信号传导的部分基因变化情况. 中华肝脏病杂志, **13**(10):763-767.]

Clements CJ, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. 2010. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization?[J] *Bull World Health Organ*, **88**(1):66-73.

Jiao JL, Liu RW, Chen LL, Li B, He BL, Zheng H, Shen PQ. 2009. The development and use of tree shrew resource and its standards research - the strategic discussion for laboratory animal resource development in china [J]. *Chn J Comp Med*, **19**(7):73-78. [角建林, 刘汝文, 陈丽玲, 李波, 何保丽, 郑红, 沈培清. 2009. 树鼩资源的开发利用与标准化研究——我国实验动物资源建设发展战略探讨. 中国比较医学杂志, **19**(7):73-78.]

Li QF, Ding MQ, Wang H, Mao Q, Wu CQ, Zheng H, Gu CM, Wang YM. 1995. The infection of hepatitis D virus in adult Tupaia [J]. *Nat Med J Chn*, **75** (10): 611-613. [李奇芬, 丁明权, 王洪, 毛青, 吴纯清, 郑红, 顾长海, 王宇明. 1995. 树鼩感染丁型肝炎病毒的实验研究. 中华医学杂志, **75** (10): 611-613.]

Li Y, Su JJ, Yan, RQ, Qin LL, Yang C, Ban KC, Duan XX, Huang GH. 1999. Expression of insulin-like growth factor (IGF-II) protein during tree shrews' hepatocarcinogenesis differently induced by AFB1 and/or HBV [J]. *J Guangxi Med Univ*, **16**(4): 395-398. [李瑗, 苏建家, 严瑞琪, 覃柳亮, 杨春, 班克臣, 段小娴, 黄国华. 1999. HBV和AFB1引起树鼩肝癌形成过程中 IGF-II 蛋白表达的动态观察. 广西医科大学学报. **16**(4):395-398.]

Li Y, Su JJ, Qin LL, Yang C, Ban KC, Luo D, Huang GH. Ou C, Yan RQ,

Wang HY. 2000a. Serial pathologic changes in liver of tree shrew during hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B and aflatoxin B1 [J]. *Chn J Clin Exp Pathol*, **16**(3): 224-227. [李瑗, 苏建家, 覃柳亮, 杨春, 班克臣, 罗丹, 黄国华, 欧超, 严瑞琪, 王辉云. 2000. 乙肝病毒和 AFB1 诱发树鼩肝癌的病理变化. 临床与实验病理学杂志, **16**(3):224-227.]

Li Y, Su JJ, Qin LL, Egner PA, Wang JS, Groopman JD, Kensler TW, Roebuck BD. 2000b. Reduction of aflatoxin B(1) adduct biomarkers by oltipraz in the tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. *Cancer Lett*. 2000, **154**(1):79-83.

Li Y, Baumgartner K, MacMillan D, Roebuck BD. 2001. Hand rearing of tree shrews [J]. *Chn J Zool*, **36**(3):32-36. [李瑗, Baumgartner K, MacMillan D, Roebuck BD. 2001. 树鼩实验种群的繁育. 动物学杂志, **36**(3):32-36.]

Li Y, Qin X, Cui J, Dai Z, Kang XN, Yue HY, Zhang Y, Su JJ, Cao J, Ou C, Yang C, Duan XX, Yue HF, Liu YK. 2008a. Proteome analysis of aflatoxin B1-induced hepatocarcinogenesis in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) and functional identification of candidate protein peroxiredoxin II [J]. *Proteomics*. **8**(7):1490-1501.

Li Y, Wan DF, Wei W, Su JJ, Cao J, Qiu QK, Ou C, Ban KC , Yang C, Yue HF. 2008b. Candidate genes responsible for human hepatocellular carcinoma identified from differentially expressed genes in hepatocarcinogenesis of the tree shrew (*Tupaia belangeri chinesis*) [J]. *Hepatol Res*, **8**(1):85-95.

Liang L, Li Y, Yang C, Su JJ, Duan XX, Cao J, Ou C, Band KC, Yue HF. 2005. Breeding of tree shrews in laboratory [J]. *Sichuan J Zool*, **24**(2):199-201. [梁亮, 李瑗, 杨春, 苏建家, 段小娴, 曹骥, 欧超, 班克臣, 岳惠芬. 2005. 树鼩实验室繁殖及育幼的探讨. 四川动物, **24**(2):199-201.]

Liang L, Li Y, Yang C, Cao J, Su JJ, Chen MW, Ban KC, Ou C, Duan XX, Yue HF. 2006. Perinatal and young tree shrews infected with human hepatitis B virus [J]. *Chn J Zoon*, **22**(8): 792-795. [梁亮, 李瑗, 杨春, 曹骥, 苏建家, 陈茂伟, 班克臣, 欧超, 段小娴, 岳惠芬. 2006. 用人工繁育的围生期和幼年树鼩感染人乙型肝炎病毒的初步研究. 中国人兽共患病学报, **22**(8):792-795.]

Lim SG, Mohammed R, Yuen MF, Kao JH. 2009. Prevention of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, **24**(8):1352-1357.

Novacek MJ. 1992. Mammalian phylogeny: shaking the tree [J]. *Nature*, **356**(6365):121-125.

Pang QF, Wan XB, Xu AY, Wang ZM, Wang GX, Zhu BY, Zhang XS. 1981. Hepatitis B virus (HBV) infection in the experimental tree shrews (Abstract) [J]. *J Med Res*, **9**:11-12.. [庞其方, 万新邦, 胥爱源, 王祖铭, 王桂香, 朱宝友, 张新生. 1981. 乙型肝炎病毒(HBV)感染树鼩的实验研究(摘要). 医学研究杂志, **9**:11-12.]

Qin LL, SU JJ, Li Y, Yang C, Ban KC, Yan RQ. 1998. Expression of insulin-like growth factor II, p53, p21 and HBxAg in precancerous events of hepatocarcinogenesis induced by AFB1 and/or HBV in Tupaia [J]. *Chn J Hepatol*, **6**(3):155-157. [覃柳亮, 苏建家, 李瑗, 杨春, 班克臣, 严瑞琪. 1998. HBV 与 AFB1 诱发树鼩肝癌前病变过程中癌基因的表达. 中华肝脏病杂志, **6**(3):155-157.]

Qin X, Dai Z, Cui JF, Su JJ, Cao J, Ou C, Li S, Chen XY, Xie L, Wang J, Yue HY, Li Y, Liu YK. 2006. Differentially expressed proteomics during hepatocarcinogenesis of tree shrew induced by aflatoxin B1 [J]. *Chn J Lab Med*, **29**(6):538-542. [秦雪, 代智, 崔杰峰, 苏建家, 曹骥, 欧超, 李山, 陈晓燕, 谢丽, 王健, 岳海英, 李瑗, 刘银坤. 2006. 黄曲霉毒素 Bl 诱发树鼩肝癌过程中的差异表达蛋白质分析及意义. 中华检验医学杂志, **29**(6):538-542.]

Springer MS, Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ. 2003. Placental mammal diversification and the Cretaceous-Tertiary boundary [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **100**(3):1056-1061.

Su JJ, Yan RQ, Gan YQ, Zhou DN, Huang DR, Huang GH. 1987. Adult tree shrews experimentally infected with hepatitis B virus [J]. *Chn J Pathol* **16**(2):103-105. [苏建家, 严瑞琪, 甘友全, 周德南, 黄定瑞, 黄国华. 1987. 成年树鼩实验感染乙型肝炎病毒的研究. 中华病理学杂志, **16**(2):103-105.]

Su JJ, Wang Y, Yang C, Huang DR, Hiroaki O, Yan RQ.1992. Human HBV DNA can integrate into the liver cell gene of tree shrew [J]. *Chn J Pathol*, **21**(5):308-309. [苏建家, 王宇, 杨春, 黄定瑞, 冈本宏明, 严瑞琪.1992. 人 HBV DNA 能整合入树鼩肝细胞基因. 中华病理学杂志, **21**(5):308-309.]

Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, Jemal A, Ward EM. 2010. The global burden of cancer: priorities for prevention [J]. *Carcinogenesis*, **31**(1):100-110.

Walter E, Keist R, Niederost B, Pult I, Blum HE. 1996. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, **24**(1):1-5.

Wang FS, Chen NS, Wang Y, Liu Y, Du SS, Feng BF. 1996. Non-specific reaction in the study of Tupaia animal model inoculated with HBV-rich humans sera [J]. *J Beijing Med Univ*, **28**(5):340-342. [王凤水, 陈红松, 王宇, 刘艳, 杜绍时, 冯百芳. 1996. 树鼩感人乙肝病毒动物模型研究中的非特异性反应. 北京医科大学学报, **28**(5):340-342.]

Wang HP, Yao ZQ, Zhou YX, Hong S, Li GY. 1998. Evaluation of experimental infection by human hepatitis B virus in adult tree shrews [J]. *Chn J Hepatol*, **6**(2):96-97. [王海平, 姚志强, 周永兴, 洪沙, 李光玉. 1998. 树鼩实验感染乙型肝炎病毒的再评价. 中华肝脏病杂志, **6**(2):96-97.]

Yan RQ, Su JJ, Chen ZY, Liu YG, Gan YQ, Zhou DN. 1984. A preliminary study on experimental infection of human hepatitis B virus in adult tree shrews [J]. *J Guangxi Med Univ*, **1**(1):10-15. [严瑞琪, 苏建家, 陈志英, 刘由庚, 甘有全, 周德南. 1984. 人乙型肝炎病毒实验感染成年树鼩的初步研究. 广西医学院学报, **1**(1):10-15.]

Yang F, Cao J, Zhang JJ, Wang Q, Su JJ, Yang C, Ou C, Shi JL, Wang DP, Li Y. 2009. Long-term observation of hepatitis B virus (HBV) replication in new-born tree shrews inoculated with HBV [J]. *Chn J Hepatol*, **17**(8): 580-584. [杨芳, 曹骥, 张晶晶, 王琦, 苏建家, 杨春, 欧超, 史俊林, 汪多平, 李瑗. 2009. 新生期树鼩接种人乙型肝炎病毒的长期实验观察. 中华肝脏病杂志, **17**(8):580-584.]

Yan RQ, Su JJ, Huang DR, Huang GH, Yang C. 1989. Human hepatitis B virus and aflatoxin B1 induced hepatocellular carcinoma in tree shrew [J]. *Chn J Pathol*, **18**(1):19-22. [严瑞琪, 苏建家, 黄定瑞, 黄国华, 杨春. 1989. 人乙型肝炎病毒和黄曲霉毒素 B1 诱发树鼩原发性肝癌的研究. 中华病理学杂志, **18**(1):19-22.]

Zhao P, Dai M, Chen W, Li N. 2010. Cancer trends in China [J]. *Jpn J Clin Oncol*, **40**(4):281-285.

Zhou YH, Wu C, Zhuang H. 2009. Vaccination against hepatitis B: the Chinese experience [J]. *Chn Med J:Engl*, **122**(1):98-102.

Zhuang H. 2009. Strengthen the prevention and treatment of hepatitis B [J]. *J Peking Univ :Health Sci*, **41**(3):259-562. [庄辉. 2009. 加强乙型肝炎防治. 北京大学学报: 医学版, 2009, **41**(3):259-562.]